






Self-sustained, sequence replication system.**Publication number:** JP3152927 (B2)**Publication date:** 2001-04-03**Inventor(s):****Applicant(s):****Classification:****- international:** C12Q1/68; C12Q1/70; C12Q1/68; C12Q1/70;
(IPC1-7): C12Q1/68; C12N15/09**- European:** C12Q1/70B2B; C12Q1/68D8**Application number:** JP19900501879T 19891214**Priority number(s):** US19880285467 19881216**Also published as:** EP0373960 (A2)
 EP0373960 (A3)
 EP0373960 (B1)
 ZA8909593 (A)
 WO9006995 (A1)[more >>](#)

Abstract not available for JP 3152927 (B2)

Abstract of corresponding document: EP 0373960 (A2)

The present disclosure provides details of an invention comprising an amplification system for the detection of target nucleic acids, most particularly target nucleic acid sequences, in an isothermal setting wherein all of the reagents necessary to conduct the amplification are present and the reactions are self-sustaining and continuous. Featured is a selective enzymatic digestion of a RNA/DNA duplex, formed by hybridization of a DNA primer with target nucleic acid, thus freeing the DNA strand for further hybridization followed by primer extension to provide a DNA duplex that can serve as a template for production of a plurality of transcripts that can be recycled and/or detected as such for deduced presence of target nucleic acid sequence.

Data supplied from the [esp@cenet](#) database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3152927号
(P3152927)

(45) 発行日 平成13年 4 月 3 日 (2001. 4. 3)

(24) 登録日 平成13年 1 月 26 日 (2001. 1. 26)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

請求項の数23(全 14 頁)

(21) 出願番号 特願平2-501879

(86) (22) 出願日 平成 1 年 12 月 14 日 (1989. 12. 14)

(65) 公表番号 特表平4-503451

(43) 公表日 平成 4 年 6 月 25 日 (1992. 6. 25)

(86) 国際出願番号 P C T / U S 8 9 / 0 5 6 3 1

(87) 国際公開番号 W O 9 0 / 0 6 9 9 5

(87) 国際公開日 平成 2 年 6 月 28 日 (1990. 6. 28)

審査請求日 平成 8 年 11 月 25 日 (1996. 11. 25)

(31) 優先権主張番号 2 8 5 , 4 6 7

(32) 優先日 昭和 63 年 12 月 16 日 (1988. 12. 16)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(73) 特許権者 999999999

アクソ・ノベル・ナムローゼ・フェンノ
ートシャップ

オランダ王国6824ベール・アンヘム,
フェルベルヴェヒ 76

(72) 発明者 ジンジェラス, トーマス・レイモンド
アメリカ合衆国カリフォルニア州92024,
エンシニタス, ジュニパー・ヒル・ドラ
イブ 1528

(72) 発明者 グアテリイ, ジョン・シー
アメリカ合衆国カリフォルニア州92117,
サンディエゴ, ルナ・アベニュー 2278

(74) 代理人 999999999

弁理士 社本 一夫 (外 4 名)

審査官 上條 肇

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己持続性、配列複製システム

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 標的RNA配列に対応する配列をコードし、
作用可能なポリメラーゼ プロモーターを持つ二本鎖DN
Aを調整する方法で、

a) 標的核酸配列のセグメントの相補体である配列を作用
可能なように伴ったRNAポリメラーゼ プロモーター
配列を含む第 1 のDNAプライマーを提供し、

b) 適当なハイブリダイズ条件下前記の第 1 のDNAプラ
イマーを前記標的核酸配列を含んでいるであろう核酸試
料と接触させ、

c) DNAポリメラーゼ伸長反応において前記第 1 のDNAプ
ライマーと前記核酸配列のハイブリダイゼーション生成
物のプライマー伸長を可能にして対応するRNA/DNAデュ
ープレックス核酸を生成させ、

d) 前記RNA/DNAデュープレックス核酸のRNA鎖を酵素的

2

に選択的に消化し、

e) 第 2 の核酸プライマーの適切なハイブリダイゼーシ
ョン条件下cDNA鎖を含む遊離されたプロモーターへのハ
イブリダイゼーションを可能にし、前記第 2 の核酸プラ
イマーは前記選択消化の生成物であり、および

f) DNAポリメラーゼ伸長反応において、前記DNA鎖を持
つプライマーのハイブリダイゼーション生成物のプライ
マー伸長を可能にすることからなる方法。

【請求項 2】 前記核酸標的配列を含んでいるであろう核
酸試料中の少なくとも 1 つの特異的標的核酸配列の検出
に有用な請求項 1 に記載の方法で、

g) 調製された請求項 1 の二本鎖DNAを多数のRNA転写体
(各々が前記標的核酸配列に対応するRNA配列を運んで
いる) の調製のための二本鎖DNA鋳型として用いる追加
段階を含む方法。

10

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3152927号

(P3152927)

(45) 発行日 平成13年 4 月 3 日 (2001. 4. 3)

(24) 登録日 平成13年 1 月 26 日 (2001. 1. 26)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

請求項の数23(全 14 頁)

(21) 出願番号 特願平2-501879

(86) (22) 出願日 平成 1 年 12 月 14 日 (1989. 12. 14)

(65) 公表番号 特表平4-503451

(43) 公表日 平成 4 年 6 月 25 日 (1992. 6. 25)

(86) 国際出願番号 P C T / U S 8 9 / 0 5 6 3 1

(87) 国際公開番号 W O 9 0 / 0 6 9 9 5

(87) 国際公開日 平成 2 年 6 月 28 日 (1990. 6. 28)

審査請求日 平成 8 年 11 月 25 日 (1996. 11. 25)

(31) 優先権主張番号 2 8 5 , 4 6 7

(32) 優先日 昭和 63 年 12 月 16 日 (1988. 12. 16)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(73) 特許権者 999999999

アクゾ・ノベル・ナムローゼ・フェンノ

ートシャッブ

オランダ王国 6824 ベーエム・アンヘム,

フェルベルヴェヒ 76

(72) 発明者 ジンジェラス, トーマス・レイモンド

アメリカ合衆国カリフォルニア州 92024,

エンシニタス, ジュニパー・ヒル・ドラ

イブ 1528

(72) 発明者 グアテリイ, ジョン・シー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 92117,

サンディエゴ, ルナ・アベニュー 2278

(74) 代理人 999999999

弁理士 社本 一夫 (外 4 名)

審査官 上條 肇

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己持続性、配列複製システム

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 標的 RNA 配列に対応する配列をコードし、作用可能なポリメラーゼ プロモーターを持つ二本鎖 DNA を調整する方法で、

a) 標的核酸配列のセグメントの相補体である配列を作用可能なように伴った RNA ポリメラーゼ プロモーター配列を含む第 1 の DNA プライマーを提供し、

b) 適当なハイブリダイズ条件下前記の第 1 の DNA プライマーを前記標的核酸配列を含んでいるであろう核酸試料と接触させ、

c) DNA ポリメラーゼ伸長反応において前記第 1 の DNA プライマーと前記核酸配列のハイブリダイゼーション生成物のプライマー伸長を可能にして対応する RNA/DNA デュプレックス核酸を生成させ、

d) 前記 RNA/DNA デュプレックス核酸の RNA 鎖を酵素的

2

に選択的に消化し、

e) 第 2 の核酸プライマーの適切なハイブリダイゼーション条件下 cDNA 鎖を含む遊離されたプロモーターへのハイブリダイゼーションを可能にし、前記第 2 の核酸プライマーは前記選択消化の生成物であり、および

f) DNA ポリメラーゼ伸長反応において、前記 DNA 鎖を持つプライマーのハイブリダイゼーション生成物のプライマー伸長を可能にすることからなる方法。

【請求項 2】 前記核酸標的配列を含んでいるであろう核酸試料中の少なくとも 1 つの特異的標的核酸配列の検出に有用な請求項 1 に記載の方法で、

g) 調製された請求項 1 の二本鎖 DNA を多数の RNA 転写体 (各々が前記標的核酸配列に対応する RNA 配列を運んでいる) の調製のための二本鎖 DNA 鋳型として用いる追加段階を含む方法。

【請求項 3】前記RNA配列を検定および随意に測定する追加の工程を含む請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】前記核酸試料中の前記標的核酸配列が、それ自体内在的に存在しているか、または、作用可能なプロモーター配列を持つプライマーを持つ前記DNA標的配列のハイブリダイゼーション/プライマー伸長生成物から調製される、作用可能なようにプロモーター配列を持つ分離されたDNA鎖へハイブリダイズされたプライマーのポリメラーゼによるプライマー伸長により調製される二本鎖DNA鋳型からの転写により調製された対応するDNA標的配列外挿生成物である請求項 1, 2 または 3 の任意の 1 項に記載の方法。

【請求項 5】 h) 適切なハイブリダイゼーション条件下、前記RNA転写体と前記RNA転写体配列のセグメントの相補体である配列を作用可能なように伴ったプロモーター配列を含むDNAプライマーとのハイブリダイゼーションを可能にし、

i) DNAポリメラーゼ伸長反応において工程 h) のハイブリダイズされた生成物のプライマー伸長を可能にして対応するRNA/DNAデュプレックス核酸を形成させ、

j) 工程 i) の前記RNA/DNAデュプレックスのRNA鎖を酵素的に選択的に消化し、

k) 適切なハイブリダイゼーション条件下、工程 j) のDNA鎖生成物を含む遊離されたプロモーターと核酸プライマーのハイブリダイゼーションを可能にし、前記核酸プライマーは前記工程 j) の選択的消化の生成物であるか、または任意に作用可能なようにプロモーター配列を持つ外部からに由来するオリゴヌクレオチド プライマーであり、

l) DNAポリメラーゼ伸長反応において工程 k) のハイブリダイゼーション生成物のプライマー伸長を可能にし、および

m) 工程 l) の二本鎖DNA生成物を多数のRNA転写物の調製のための二本鎖DNA鋳型として用いる追加の工程を含む請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】RNA転写体生成物が請求項 2 のRNA転写体生成物と逆のセンスを持つ請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】 1) 逆転写酵素、 2) RNaseH活性を持つ酵素、 3) DNA-依存性RNAポリメラーゼおよび 4) プロモーター配列を作用可能なように持つ少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチド プライマー配列により提供される酵素活性が反応環境に存在することにより連続的および自発的に進行することが可能になった請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】本質的に等温で実施される請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】請求項 1 または請求項 5 の工程 l) による二本鎖核酸を、それからのプロモーターを認識するポリメラーゼにより触媒される反応においてそれらの多数のRNA転写体（各々は前記標的核酸配列に対応するRNA配列

を持つ）を調製するための鋳型として用い、前記RNA転写体の存在を検出および随意に測定することを含む方法。

【請求項 10】前記転写体がRNA複製酵素誘導による前記の転写体の複製のためにRNA複製酵素認識部位を含んでいる請求項 2 または 9 記載の方法。

【請求項 11】前記RNA転写体の検出されたRNA配列が前記試料にも含まれている核酸の既知のコピー数の存在による内部標準化様式で測定される請求項 2, 9 または 10 記載の方法。

【請求項 12】前記標的核酸配列に遺伝的または病原的疾患または状態の特性が付随している請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】前記標的核酸配列にヒト免疫不全ウイルスが付随している請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】前記標的核酸配列に欠陥遺伝子が付随している請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】プロモーターがバクテリオファージT7プロモーターであり、RNA転写体がT7 RNAポリメラーゼを使用して産生される請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 16】選択的消化がRNaseH酵素により実施される請求項 1 または 5 記載の方法。

【請求項 17】伸長反応が大腸菌DNAポリメラーゼ I により触媒される請求項 1 または 5 記載の方法。

【請求項 18】伸長反応が大腸菌DNAポリメラーゼ I のクレノー断片により触媒される請求項 1 または 5 記載の方法。

【請求項 19】伸長反応がT7 DNAポリメラーゼにより触媒される請求項 1 または 5 記載の方法。

【請求項 20】伸長反応が逆転写酵素により触媒される請求項 1 または 5 記載の方法。

【請求項 21】前記DNA転写体が検出に先立って標識される請求項 2 または 5 記載の方法。

【請求項 22】前記DNA転写体が放射性標識されている請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】前記RNA転写体が発色団標識されている請求項 21 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

〔関連出願〕

1989年 7 月 19 日に出願された米国特許出願第 07/064141 号および 1988 年 6 月 6 日に出願され、PCT 国際出願第 W0 88/10315 号として公開されたその継続出願米国特許第 07/202978 号が引用され、その各々の出願の全開示内容は明示の引例に含まれている。

〔技術分野〕

本発明は一般的に分子生物学および組換え DNA 技術の進歩に関する。

特に、本発明の試験管内および生体外道具立てにおいて生物試料中の標的核酸配列または対応する標的 DNA 配列からの外挿 RNA 配列の存在および RNA (DNA) 配列がコ

10

20

30

40

50

ードしている対応するポリペプチドの推論による検出のための必要な試薬および装置を含む検定および医薬キットを含む方法および手段を請求の範囲に含んでいる。

本発明は試験管内システムにおいて自己持続性で一つの容器中での特定の核酸標的配列の増幅を提供する用意があることを特色とし、標的核酸配列の増幅は任意の自己複製能力を持つ多数の転写体生成物の調製により達成される。この自己持続性増殖システムは温度サイクルを必要とする核酸デュープレックスの繰返し変性の必要性を避けることができる。本発明は新規様式で、単一反応道具立てで増幅生成物を形成するのに必要な試薬、または増幅された形での検出に適した生成物（標的核酸配列の存在を表わす）を混合する。

本発明の使用が可能な応用には、必要な標的核酸配列を含む体液および組織の試験管内または生体外核酸プローブ、ハイブリダイゼーション検定により特定または一般の病原性疾患または状態に特異的なDNA配列、または外挿によるもの、DMA配列の分析がある。

〔背景技術〕

本分野の1つのゴールは与えられた配列（標的核酸と称されている）がRNA、DNAまたはその両方を含む広範囲の種々の他の核酸種の中でのその存在に比較して少量で存在している生物試料中の種々の核酸配列を検出することである。それ故、例えばヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）の核酸に関連する核酸のごとき病原性疾患または状態に付随するであろうポリペプチドをコードしている核酸を検出することが望まれている。そのようなポリペプチドをコードしている核酸の検出に加え、血友病で例示されるごとく欠陥ヒトベータグロビン遺伝子の検出の場合のような欠陥遺伝子のごとき病原性疾患または状態に特徴的な他の核酸の検出も望まれている。

特徴的なことは、そのようなものに付随する核酸は、与えられた血液または他の体液のごとき生物試料または試験されるべき与えられた個体の組織試料中の全核酸に比較すると非常に少量しか存在していないことである（あったとしてもわずかである）。そのような核酸種の検出には周りに付随する種々の他の核酸種の中から検出可能および測定可能であるという特異性（もしあれば）を必要とする。これらの種のあるものは標的核酸と近い相同性をもっているであろう（少なくとも単離されたセグメント）。さらに、先に指摘したごとく、これらの標的核酸種は試験される生物試料中に非常に微量のみしか見いだされないのが普通である。しかも、潜在する疾病状態の適切な診断のためには、たとえそのような標的核酸が少量でもアッセイ系の忠実さで明確に検出可能であることが必須である。

この分野のゴール目ざしていくつかの試みが進展している。

1つの試みは試料中の核酸の量は変化されずまたは影響を受けない。代わりに、レポーター系が開発されそれ

により、容易な検出および観測のために、核酸標的に対応する多量の検出可能な分子が産み出される。そのようなレポーター系は標的核酸に付随する信号発生系であり、標的配列の分子の数の代理となる検出可能な信号を与える。

根本的に異なる別の研究方法が開発されており、ここでは標的核酸配列それ自身のコピー数が増加されている。この事は、標的核酸配列の選択的増幅により実施可能である。他の核酸配列に優先して標的核酸配列が増幅されるように試料の培養技術に改良を加えることが可能である。これらの技術は扱いにくく時間がかかるとともに試行錯誤でやらねばならない。

この試みの別の例は“ポリメラーゼ連鎖反応”（PCR）と称されている標的核酸配列の増幅法である。この技術はSaiki et al., Science, 230, 1350 (1985) および Mullis, et al., 欧州特許出願第200362および201184号（米国特許第4683195および4683202号も参照されたい）により報告されており、特徴的なことには（1）標的核酸配列のセグメントにプライマーをハイブリダイズさせ（2）ポリメラーゼで前記プライマーを伸長させ、および（3）プライマー伸長反応から生じたデュープレックスを一本鎖にすることが必然的に伴われる。この過程は多数のサイクル繰り返すことができ、そのようにして潜在的な標的核酸配列を増幅する。

改良された新規の方法が米国特許出願第07/064141および07/202978号およびPCT国際出願公開第W088/10315号（上記文献）に詳しく記載されている。そのプロモーターに作用可能なように結合された標的配列の合成二本鎖cDNAコピーと共に（およびそれから誘導される）、新規RNA転写生成工程が用いられる。転写工程が新規性の主たる特色であるため、それは便宜上転写に基づく増幅系（TAS）と称されている。

それ故その発明は核酸を含む試料中の少なくとも1つの特定の核酸配列（標的配列またはセグメント）の試験管内または生体外検出を包含しており、そのRNA-ポリメラーゼ プロモーターに作用可能なように結合されている標的配列に対応する配列を含んでいる二本鎖核酸を調製し、多数のRNA転写体の調製のための二本鎖核酸鋳型として前記二本鎖核酸を用い（各々は前記標的配列に対応するRNA配列を運んでいる）、および前記RNA配列の存在を、および標的配列の存在の類推として検出する方法から成っている。

二本鎖核酸鋳型は標的配列のセグメントに対応する配列に作用可能なように結合されているプロモーター配列を含む第1の核酸プライマーまたはプローブを提供し、前記第1の核酸プライマーを核酸を含む試料中の標的配列を適切な条件下ハイブリダイズさせ、ポリメラーゼ伸長反応で標的配列と相補的なハイブリダイズされた前記第1の核酸プライマーを伸長させて対応するデュープレックス核酸を形成させ、前記デュープレックス鎖を分離

させ、配列鎖を含む分離されたプロモーターを前記プロモーター配列の反対の末端に第2の核酸プライマーがつくような適切な条件下でハイブリダイズさせ、および前記プロモーター含有配列に相補的なハイブリダイズされた前記第2の核酸プライマーをポリメラーゼ伸長反応で伸長させる。

それ故、その発明は、標的核酸に対応する配列を持つその情報を妨害するように測定が行われない時、一本鎖RNA転写体またはそれらから形成されたRNA-DNAデュプレックスを得る。一本鎖RNA転写体生成物は離れ、多少連続性が低いので、扱いにくく誤る傾向がある反復PCRサイクルおよび鎖分離の必要性なく標的セグメントの直接検出を提供する。そのような利点は、二本鎖DNA

(その1つの鎖は標的セグメントを含み、その他の鎖は標的セグメントの相補体を含む)を得、検出前に分離を必要とし、および受容可能な増幅レベルに到達するのに非常に多くの反復サイクルを必要とするPCR技術によって提供されない。

精選実施態様として、標的核酸配列の検出を楽にするため増幅の基本的複製過程を更に利用するのが本発明の目的であり、温度の周期的変化を必要とせずに対数的コピーが達成され、その他試薬添加その他に関して増幅の過程がモニタされる。対応する標的核酸の検出および測定の手段として転写および伸長生成物操作の利点を新規の様式で組合わせるのも本発明の更なる目的である。

プライマーの核酸標的配列へのハイブリダイゼーションに続いてのプライマー伸長により形成されたRNA/DNAデュプレックスのRNA鎖の酵素的選択消化を用い、続いてのそれへのプライマー伸長の更なるハイブリダイゼーションのための鑄型としてDNA鎖を提供するための手段とすることが本発明の基本的な目的である。少なくとも1つのプロモーター配列を含む二重鎖DNAデュプレックス生成物はDNA-依存性RNAポリメラーゼにより認識され、それにより、標的核酸配列の検出および測定手段として最終的に検出および測定される多数の転写体の生成のための鑄型として働く。この目標は、(3つの)適当な酵素活性および少なくとも1つのDNA-依存性RNAポリメラーゼにより効果あるように認識可能なプロモーターを含むプライマーを含む1つの反応混合物中で温度サイクルを必要としない自己-持続性である標的配列増幅の利点を提供する。

本分野で列挙されたゴールを満たし、標的核酸配列の増幅にさらに役立つ選択的手段を提供するのが本発明の全体の目的である。受容可能な短い時間内に再現性よく利用でき、等温の反応系で、既知の試薬の都合良さを用い、終始変わらない科学的結果に到達するのに必要な精密さを持つ直接的な技術がさらに提供される；再現可能なアッセイの道具立てに使用でき、実験室/臨床的分析のためのキットに使用するのに適応可能である。

[発明の開示]

発明の要約

本発明はRNAポリメラーゼ結合配列(PBS)を含むオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションのためにDNA鎖を遊離させ、標的核酸配列の存在のための演繹アッセイとして検出および測定を受けやすい多数の対応するRNA転写体の調製のための鑄型として働くことができるDNAデュプレックスを形成するため続いてプライマー伸長を行うRNA/DNAデュプレックス“鎖一分離”手段の使用に基づいている。RNA/DNAデュプレックスは順に、作用可能なプロモーター配列を含むDNAプライマーをRNA標的へハイブリダイズさせ、続いてプライマー伸長により作製される。

“鎖一分離”を起こさせるための本発明の手段としては、RNaseHのごときRNaseH-様活性を持つ酵素の使用が挙げられ、それはさらなる処理のためのDNA鎖を遊離するようにデュプレックスのRNA鎖を選択的および優先的に消化するであろう。そのような酵素の使用は前記デュプレックスの変性するための温度サイクルの使用をなくしている。

核酸標的配列は核酸試料中のごとく本来存在しているものでもよいし、対応するDNA標的配列外挿生成物であってもよい。外挿生成物は二本鎖DNA標的配列の変性、作用可能なように付随しているプロモーター配列を持つプライマー配列中へのハイブリダイゼーションに続いてのプライマー伸長反応によりDNAデュプレックスを形成させることにより調製された。このDNA/DNAデュプレックスは順に、変性され、プロモーター配列を含む鎖は第2のプライマーを持つプロモーターの反対側にその末端でハイブリダイズされ、DNAデュプレックスを形成し、それはDNA-依存RNAポリメラーゼと接触した時対応する転写、外挿生成物を産生する。RNAは次に本発明の目的のため、標的核酸配列として働く。

核酸標的配列(その起源が何であり)が提供された後、本発明に従って、プロモーター配列に作用可能なように付随しているプライマー配列にハイブリダイズされ、続いてプライマー伸長により、DNA鎖の5'末端にプロモーター配列を含むRNA/DNAデュプレックスを産生させる。プライマー伸長反応は逆転写酵素のごとき任意の適したポリメラーゼで実施できるであろう。本発明の基本的態様では続いてRNaseHのごときRNA鎖を選択的に消化する酵素でのRNA/DNAデュプレックスの処理でありRNA/DNAデュプレックスのDNA鎖の遊離に働く。そのようにして遊離されたDNA鎖は1)前の選択的消化により生じたRNAプライマーを通した自己-発生的プライマー伸長にいくか、または2)作用可能なプロモーター配列を任意に運ぶ外来的に誘導されたオリゴヌクレオチドプライマーとハイブリダイズされる。プライマー伸長は二本鎖DNAデュプレックス(1つまたは2つのプロモーター配列を含む)を作り出し、それはDNA依存性RNAポリメラーゼ誘発の転写の鑄型として働き、多数の転写

体を与える。

前述の反応系列が等温で、3つの適当な酵素活性（例えば、逆転写酵素、RNaseHおよびDNA-依存性RNAポリメラーゼによって提供されるような）が同時に存在する混合物中で実施できると仮定すると、前述の方法の種々の工程は与えられた時間に連続的、同時進行様式で行われる。それ故上で終点として示された時点で生成された転写体は、出願標的核酸配列の演繹的存在のための検出および測定が可能である。しかしながら、前述の反応系列の連続性および同時性が温度サイクルとは独立し、これらの反応の実施に必要とされる酵素活性のただ1度の最初の添加を必要としていると仮定すれば、転写体生成物それ自身、ほかのプロモーター配列を働ける状態で随意に運んでいるプライマーとのハイブリダイゼーションを起こす。このハイブリダイゼーション複合体は続いてのプライマー伸長反応により、第2のRNA/DNAデュプレックスを産生し、それは順に、選択的RNA消化の作用を受け、それからDNA鎖を遊離する。それは順に自己-発生RNAプライマーまたはプロモーター配列を働ける状態で随意に運んでいるであろう反応混合物中に存在する外来的に誘導されたオリゴヌクレオチドプライマーとハイブリダイズし、第2のDNAデュプレックスを生成し、それはDNA-依存RNAポリメラーゼによる認識を受け、最初に生成された転写体と逆の意味を持つ多数の転写体が生成される。

前述の反応系列の機構は完全には解明されていないが、反応混合物が3つの適当な酵素活性（例えば逆転写酵素、RNaseHおよびDNA-依存性RNAポリメラーゼにより提供されるものごと）および少なくとも1つのプライマー（ポリメラーゼにより認識されるプロモーターを含む）を用いるためであり、反応が温度サイクルに依存しないためだと信じられており、2つのプロモーター含有オリゴヌクレオチドプライマーが使用される場合、反応はいくつかのサイクルを自発的に連続的に回ることが期待され、正および逆の両方の転写体が生成され、それは種々な方法で検出および測定され、試験された試料中に存在する標的核酸の量の増幅アッセイ法が提供される。

本発明の本質は、より高いおよびより低い温度の間を循環させる必要なく、および酵素または他の試薬を周期的に添加する必要なく、適当な温度で一定期間、本質的に休止状態のまゝにされた反応混合物を提供することであり、それにより標的核酸配列は、少なくとも1つのプロモーター配列を働ける状態で運んでいるプライマーおよびRNAポリメラーゼ（プロモーターのポリメラーゼ結合部位を認識する）により提供されるとき酵素活性、逆転写酵素、RNaseH（RNAがデュプレックスの形でDNAへハイブリダイズされている場合に選択的にRNAを消化する）のごとき酵素、およびRNAポリメラーゼおよび逆転写酵素の基質として必要なヌクレオシド三リン酸の存在下、自己-持続性様式で連続的におよび自発的に増幅さ

れる。ここに記載したとき系においては、例えばT7 RNAポリメラーゼ、AMV逆転写酵素および大腸菌RNaseHを用い、約37℃にて約2時間では 10^7 の高さの再現可能増幅レベルが達成できる。約4℃および約50℃（好適なのは40℃周辺の範囲）の温度が実施可能である。好適な実施態様における核酸標的配列の大きさは、約250塩基より小さなものである。使用されるRNAポリメラーゼ、使用される逆転写酵素、pH、塩濃度、ヌクレオシド三リン酸濃度のごとき他の変化するものも増幅の最適化に影響を及ぼすであろう。これらの変化するものは当業者の通常の知識範囲内である。

それ故、本発明は雑多な集りのRNAを含む試料中の少なくとも1つの特定の核酸標的配列の試験管内または生体外検出を含んでいる。本発明は標的配列に対応する配列をコードし、動作可能なRNAポリメラーゼ プロモーターを持つ二本鎖DNAを調製することから成る方法に縮小され、前記二本鎖DNAは順にRNA選択性消化酵素の作用によりRNA/DNAデュプレックス中のそのRNA相補体から遊離されたDNA鎖へプライマー伸長によるハイブリダイゼーションにより調製され、前記RNA/DNAデュプレックスは動作可能なプロモーター配列を運ぶプライマーの標的核酸配列へのハイブリダイゼーション続いてのプライマー伸長により形成されている。二本鎖DNAは多数のそれからのRNA転写体（各々は前記標的核酸配列に対応するRNA配列を運んでいる）の調製のための鋳型として働く。前記RNA配列の存在が（および標的配列の存在の演繹により）検出および測定される。

本発明はそのようなRNAの転写体の調製の方法および手段および使用に付随するすべてのものを請求の範囲に含んでいる。1つの実施態様において、本発明は上で定義した前記二本鎖核酸鋳型を調製する随意的反復性方法を請求の範囲に含んでおり、標的核酸配列のセグメントに対応する配列へ使用可能に結合されたプロモーター配列を含む第1の核酸プライマーを提供し、適当な条件下前記第1の核酸プライマーを核酸を含む試料中の標的核酸配列とハイブリダイズさせ、ハイブリダイズさせた前記第1の核酸プライマー（標的配列に相補的）をポリメラーゼ伸長反応で伸長させて対応するRNA/DNAデュプレックス核酸を形成し、前記RNA/DNAデュプレックスのRNAを酵素的に切断し、適当な条件下遊離されたプロモーター含有DNA配列鎖へ第2の核酸プライマーを1) 生成物誘導RNAプライマーまたは2) 作用可能なように結合されているプロモーター配列を任意に含むオリゴヌクレオチドプライマーを通して前記プロモーター配列の反対の末端にハイブリダイズさせ、前記プロモーター含有配列に相補的なハイブリダイズされた前記第2の核酸プライマーを伸長させる。

さらなる実施態様における本発明は前記二本鎖核酸をプロモーターを認識するDNA-依存性RNAポリメラーゼにより触媒される反応においてそれからの多数のRNA転写

体の調製のための鋳型として用い、さらに任意に上に記載したごとくサイクルを回した後、前記RNA転写体の存在を検出および測定する方法および手段について特許請求している。

さらなる実施態様における本発明は、そのようにしてまたは標的DNA配列からの外挿生成物として発生された標的核酸配列の増幅する方法の改良を請求の範囲に含んでおり、前記標的配列と作用可能なように結合されたプロモーター配列を持つDNAプライマーをハイブリダイズさせ、続いてプライマー伸長により対応するRNA/DNAデュプレックスを与え、前記デュプレックスのプロモーター配列を持つ遊離されたDNA伸長生成物と第2のプライマーをプロモーター配列の反対の末端にハイブリダイズさせ、続いてプライマー伸長により、検出のためまたは前に記載したごとくサイクルのための随意に複製可能なRNA転写体の調製に有用な二本鎖DNA鋳型を形成させることを特徴とする。改良は前記RNA/DNAデュプレックス プライマーのプロモーター配列を持つ伸長生成物DNA鎖の遊離が前記RNA/DNAデュプレックスのRNA鎖の選択的酵素消化によることを特徴としている。

1つの実施態様において、本発明はプロモーター配列のDNA配列の5'末端に結合されていたRNA/DNAデュプレックスRNAの選択的RNA消化酵素による処理法の生成物の特許請求している。

さらなる実施態様において、本発明は前述の方法および手段を用い、RNAを含む試料中の少くとも1つの特定の核酸標的配列の試験管内または生体外検出に有用な必要な試薬および付随する手段から成るキットを特許請求している。

発明の詳細な説明

1. 図の簡単な説明

図1は本発明の実施態様の模式的表現を表わしている。模式的表現は全部で12の工程を与えているが、好適な態様では、反応混合物中標的配列と一緒に必要な3つの酵素が存在し、実施可能な温度が与えられればそれらは連続的な自己発生工程と考えられる。3つの酵素は掲げられているとおりであり、例えばプライマー伸長反応に使用されている逆転写酵素、選択的RNA消化酵素であるRNaseHは本発明の基本的態様を表わし、T4 RNAポリメラーゼはDNAデュプレックス鋳型から転写体を調製するために有用な酵素の例である。上に示したごとく本発明の本質は模式的表現の工程3で表わされ、工程6のRNA転写体生成物はそのまゝ検出され測定されるかまたは工程7から12に掲げてあるごとく連続的の反応にかけRNA転写体のアンチセンス鎖を形成される。発生させられたRNA転写物は標的核酸配列の存在の結果として生じるものとして検出され測定される。PBSはプロモーター配列のポリメラーゼ結合部位を表わす。TCSは標的相補配列を表わす。

2. 一般的方法および定義

定義および本発明の基本的技術を実施するための方法および手段を含んでいる分子生成物の標準的教科書が参考にされた。たとえば：

DNAプローブまたはプライマー調製、DNA合成または制限酵素切断による天然起源からの配列の単離および、ここでプライマーまたはプローブとして使用する為、そのまゝまたは他のDNAへの結合する時に適するような尾付けを含む；

ハイブリダイゼーションに使用するための異った機能的配列を持つオリゴヌクレオチドの調製；

標的DNA配列に対してのプライマーの相同性の程度に必然的に依存するハイブリダイゼーションを多少生成するためのストリンジェンシー条件の変化を含むハイブリダイゼーション方法論；

プロモーターまたはより特異的なプロモーターまたはバクテリオファージDNA-依存性RNAポリメラーゼおよびバクテリオファージRNA-依存性RNAポリメラーゼまたは真核生物系を用いた場合のウィルスDNAおよびRNA-依存性RNAポリメラーゼ（例えばアデノウィルスコード化RNAポリメラーゼおよびブロームモザイクウィルスRNAポリメラーゼ）により認識される部位の同定、単離または調製；

上に示した前記プロモーターを認識でき、またはプライマー伸長反応が可能なRNAポリメラーゼの同定、単離または調製；

RNA転写体の産生を導く条件、いわゆる転写一促進配列を含む；

DNA依存性ポリメラーゼおよびdNTPの使用を含むプライマー伸長反応の開始および維持を導く条件；

（誘導された）複製のための機構および方法論；など。

例えば、Nanias et al., *モレキュラー クローニング：実験室手引*, コールドスプリング ハーバー ラボラトリー, ニューヨーク (1982), および Colowick et al., *Methods in Enzymology* Vol. 152, アカデミックプレス, Inc. (1987), および種々の参考文献がそれに引用されている；Hong, *Bioscience Reports* 1, 243 (1981)；Cooke et al., *J. Biol. Chem.* 255, 6502 (1980)；および Zoller et al., *Methods in Enzymology* 100, 468-500 (1983)；Cvea et al., *Nucleic Acids Res.*, 8, 2331 (1980)；Narang et al., *Meth. Enzyme* 68, 90 (1979)；Beauche et al., *Tetrahedron Letters* 22, 1859 (1981)；Brown et al., *Meth. Enzym.* 68, 109 (1979)；Caruthers et al., *Meth. Enzym.* 154, 287 (1985)；Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255, 2073 (1980)；Lee et al., *Science* 239, 1288 (1988)；Milligan et al., *Nucleic Acids Res.* 15, 8783 (1987)；Miller et al., *Virology* 125, 236 (1983), Ahlquist et al., *J. Mol. Biol.* 153, 23 (1981)；Miller et al., *Nature* 313, 68 (1985), Ahlquist et al., *J. Mol. Biol.* 172, 369 (1984)；Ahlquist et al., *Plant Mol. Bio*

1. 3, 37 (1984) ; Ou et al., PNAS 79, 5235 (1982) ; Chu et al., Nucl. Acids Res., 14, 5591 (1986) ; 欧州特許出願公開第 (EPA) 194809号 ; Mursh et al., Positive Strand RNA Viruses, p. 327-336, Alan R. Liss (発行, ニューヨーク 1987 ; UCLA シンポジウム抄録 (1986) ; Miller et al., J. Mol. Biol. 187, 537 (1986) ; Stoflet et al., Science, 239, 491 (1988) ; Kramer et al., J. Mol. Biol. 89, 719 (1974) ; Saris et al., Nucl. Acids Res., 10, 4831 (1982) ; Bresser et al., PNAS 80, 6523 (1983) ; Chu et al., Nucleic Acids Research 16, 3671 (1988) ; Gubler et al., Gene 25, 263 (1983) および D' Alessio et al., Nucleic Acids Res 16, 1999 (1988) 、同様にその中に参考文献が引用されている。

前に引用された発表物のすべてがここに特別に引例として含まれている。

術語“プロモーター”はRNAポリメラーゼにより特異的に認識される核酸配列（天然に存在するものまたは合成的に生成されたものまたは制限消化の生成物）を意味し、RNAポリメラーゼは認識される配列に結合し、転写の過程を開始し、それによりRNA転写体が産生される。随意に実際の認識部位を越えて拡がるヌクレオチド塩基を含んでいてもよく（分解過程に対し追加の安定性を添えと考えられる）、転写開始部位に隣接する追加のプラス（+）ヌクレオチドを含んでいてもよい。原理的に、任意のプロモーター配列を使用してもよく、それに対し、開始配列を認識できる既知で入手可能なポリメラーゼがある。典型的には、既知で有用なプロモーターはバクテリオファージ T3、T7 または SP6 のときある種のバクテリオファージ ポリメラーゼにより認識されるものである。

Siebeul et al., Cell 20, 269 (1980) 。これらはしかし、その付随するプロモーター配列と共に本発明の実施に使用することができるポリメラーゼの例にすぎない。

“RNA転写体”とはRNAポリメラーゼ プロモーター配列（上記参照）の認識に続いての転写開始後に産生されるリボ核酸配列である。そのような転写体の産生は多少連続的であり、存在するポリメラーゼの濃度に一部依存する。

本文脈中の術語“プローブ”または“プライマー”は標的配列に対し十分な相補的を持つ一本鎖核酸配列（天然に存在または合成的に生成されたものまたは制限消化の生成物）を意味し、そのため適したハイブリダイゼーション条件下、適当な（標的）配列にハイブリダイズする（すなわち結合する）ことが可能である。典型的なプローブまたはプライマーは少くとも10ヌクレオチドの長さであり、最も好適には約20またはそれ以上の長さのヌクレオチド塩基であり、最も好適な実施態様においては、適当な（標的）配列と同一性または非常に高い相補性を共有している。例えば、EPA 128042 (84年12月12日公

開）を参照されたい。そのようなプローブまたはプライマーは適当な試薬および条件の存在下プライマー伸長反応のための相補配列にハイブリダイズするであろうようなものである。

術語“作用可能のように結合された”または“付随された”またはその文法的変化体、特にRNAコードDNA配列内のプロモーター配列の結合に関連して、プロモーターが適切なポリメラーゼにより認識された時対応するRNA転写体を産生するその機能性を示す—上記文献参照。

放射性標識または発色体感受性酵素を用いる発色体法によるごとき検出信号の生成技術はまた本分野でよく知られており、情報が供給されている。

本発明のアッセイ法が実施される試料は血清または他の体液、組織培養培地または食品材料のごとき生物材料の生の試料であってよい。より典型的には、標的の検出を妨害するであろう（親和性分子の非特異的結合を起こすことにより）物質を除去するために種々の処理がされた生の試料から誘導された処理試料である試料に対し本方法が実施される。本発明のアッセイ法により適した試料を得るための生の試料処理法は本分野ではよく知られている。

転写体（RNA）は多数の異った方法で検出できる：

例えば接触ホトプリンティング法（Kutateladze et al., Anal. Biochem. 100, 129 (1979)）によるRNAの紫外吸収により検出できる。

反応に放射活性標識リボヌクレオシド 5'—三リン酸（例えば³²P—標識またはアルファ—³²P—標識）を使用することによりRNAが放射活性であり、RNAはその放射活性により多数の既知の方法により検出できる。

30 ビオチンまたはイミノビオチンをRNA内へ取り込ませることもでき、RNA—結合ビオチンに結合し、都合の良い演出可能な発色団の生成を触媒する酵素—アビジンまたは酵素—ストレプトアビジン付加物による既知の技術により検出できる。ビオチンまたはイミノビオチンの取り込みはウラシル部分の炭素—5がスパーサーを通してビオチニル化されているUTPを複製反応中の複製の基質として用いることにより達成される。そのようなUTPは既知の化合物である。さらに、そのようなUTPがQB複製酵素の基質であり、炭素の5位へ結合されたスパーサー基を通してビオチニル化されたウラシルを含むRNA（その合成にそのようなUTPを使用したため）はQB複製酵素触媒複製の鋳型であることが知られている。複製RNAの3'—末端へ蛍光性になるよう改変されたヌクレオチドを付けるT4 RNAリガーゼ触媒反応を用いてRNAを蛍光性にすることができる。Cosstick et al., Nucl. Acids Res. 12, 1791 (1984) 参照。得られるRNAの蛍光はいくつかの標準的技術よりRNAの検出に用いることができる。

RNAの検出に使用することができる他の方法はレポーター物質（核酸に特異的に結合する）を複製が起こっている系または複製されたRNAが単離されているECTEOLA紙

ごとき陽性に荷電された支持体のような培質へ添加し、レポーター物質からの信号が測定される方法である。そのような物質としては：発色色素、“全染色”のごとき、(Dahlberg et al., J. Mol. Biol. 41, 139 (1969))；メチレン ブルー (Dingman et al., Biochemistry 7, 659 (1968)) および銀染色 (Sammons et al., Electrophoresis 2, 135 (1981))；Igloi, Anal. Biochem. 134, 184 (1983)；RNAへ結合する蛍光性化合物——例えば、エチジウム ブロミド (Sharp et al., Biochemistry 12, 3055 (1973))；Bailey et al., Anal. Biochem. 70, 75 (1976))；およびQB複製酵素により複製するための鋳型であるRNAへ特異的に結合する蛍光性化合物——例えば、QB複製酵素のウィルスサブユニットに連結されているフィコビリプロテイン (Oet al., J. Cell Biol. 93, 981 (1982))；Styer et al., 米国特許第4,520,110号)

本発明に従ったアッセイにおいては、試験および対照試料に対し可能なかぎり類似の条件下同時にアッセイが実施される。本分野で理解されているごとく、対照試料は試験試料と同じであるが、標的を含んでいないかまたは既知の量を含んでいるのが既知である。標的のない対照から“バックグラウンド”が確立され、それ以下では標的を含む試料を含まない試料から区別するのは不可能である。試験試料のアッセイで生成されるRNAの量または濃度をアッセイされた対照試料を同時に比較することにより、バックグラウンドより上の試験試料中の標的の存在が決定できる。ある範囲の既知の標的濃度を持つ対照試料を用いると、試験試料中の標的の濃度を算出することができる。

本発明の任意に複製可能なRNA転写体の複製の誘導のための（自己触媒性）“複製酵素”の使用は本分野では一般的に既知である。本発明に有用であるそのような複製酵素の適切な例としては与えられたRNA転写体の末端である種の核酸配列部位を認識する、いわゆるQBウィルス複製酵素および与えられたRNA転写体の3'末端で核酸配列部位を認識すると考えられているいわゆるブroomモザイク ウィルス (BWV) ならびにアルファ ウィルス複製酵素が挙げられる。これらの複製酵素はRNA転写体および相補体の複製（再生産できる）に働き、そのコピーを増大させる。そのような酵素が転写の過程の間反応液中に存在した場合、転写の間に生成される多数の転写体はそれ自身で複製できRNA転写生成物量が指数的に増加することが予知できる。

3. 実施態様の詳細な説明

本発明の真髄は、熱にサイクルまたは補給酵素の添加の必要なく、試験管内で増幅の完全多サイクルをなす能力である。本明細書に付随する図は好適な実施態様のスキームを図式様式で略述したものである。本発明の原理的および注目すべき態様は酵素RNaseHの包含である。図をさらに参照すると、工程1および2はいわゆるTASプロトコル（この明細書の始めの部分で参考になされてい

る特許出願およびPCT国際出願参照）に用いられるものと同一であるが、工程3においては熱変性工程の代わりにRNaseHの使用によりRNA/DNAハイブリッド デュプレックスは“鎖一分離”される。RNaseH活性はRNA/DNAハイブリッド デュプレックス中に存在している場合のみ、RNAに対する特異性を持っている。この消化の生成物は独特のRNAオリゴマーまたは多数のRNAオリゴマーであろう（工程4）、順に、これらのオリゴマーはcDNA反応の触媒として逆転写酵素（RT）を用いるDNA合成のためのプライマーとして働くことができる（工程5）。工程5に示された二本鎖DNAはT7RNAポリメラーゼ配向性転写のための鋳型として働くことができる（工程6）。この増幅されたRNA生成物はここで標的配列のための検出レポーター分子として働くかおよび/または自己-サイクル反応を続けるための更なる標的分子として働く（工程7から12）。

約 10^6 倍の標的増幅が得られる最も成功した反応は、3つの酵素およびT7RNAポリメラーゼ結合配列（PBS）を含む2つのオリゴヌクレオチド プライマーで作用させたものである。必要な酵素はAMV逆転写酵素、T7 RNAポリメラーゼおよび大腸菌RNaseHである。反応液への大腸菌RNaseHの添加はAMV逆転写酵素に存在するRNaseH活性を補充し、高いレベルの増幅を産み出すようである。標的配列の長さの中央におく最適なオリゴヌクレオチドプライマーの選択、1つまたは両方のプライマー上でのポリメラーゼ結合配列の包含および転写プロモーターとしてのポリメラーゼ結合配列-含有プライマーの効率。3つすべてが増幅のレベルに影響を及ぼす。2つのオリゴヌクレオチド プライマー（各々PBSを含んでいる）の包含は単1 PBS-含有プライマーおよび非1-PBS-含有プライマーの包含での増幅よりも大きな増幅が起こった。

付随する図を参考にして：

(1) mRNA標的分子がT7 RNAポリメラーゼプロモーター結合配列をとり入れている標的特異性合成オリゴデオキシリボヌクレオチドとアニール化される、

(2) このプライマーがAMV逆転写酵素のDNAポリメラーゼ活性により伸長されて第1のcDNA鎖が合成され、

(3) AMV逆転写酵素および大腸菌RNaseHのRNaseH活性がRNA/DNAハイブリッド デュプレックスのRNAを分解し、第2のcDNA鎖合成のための鋳型としてDNAが利用できるようになし、

(4) RNaseH消化から生じた自己-発生オリゴリボヌクレオチドまたは好適にはT7 RNAポリメラーゼ プロモーター結合配列（図には示されていない）をとり込んでいる合成オリゴデオキシリボヌクレオチドで第2cDNA鎖合成の用意する。AMV逆転写酵素がプライマーを伸長させ、作用可能なT7 RNAポリメラーゼ プロモーター結合配列をとり込んだ二本鎖DNAが形成される。

(5) T7 RNAポリメラーゼが二本鎖プロモーター結合

配列へ結合し標的核酸に相補的なRNAのコピーを転写する、

(6) PBSを持つ第2のオリゴデオキシリボヌクレオチド プライマーがRNA転写体へアニール化される、

(7) AMV逆転写酵素がcDNA鎖の合成を触媒する、

(8) RNaseHがRNA/DNAハイブリッドデュプレックスのRNAを分解しDNAを第2の鎖合成のための鋳型として利用可能なようにする、

(9) オリゴデオキシリボヌクレオチド プライマーを第2のcDNA鎖とハイブリダイズされ、AMV逆転写酵素でDNAを合成する。転写が起こり、サイクルは引き続く。

4. 実施例

1. 第1-HIV-1 env 領域の増幅

HIV-1 RNAの1領域が等温酵素反応で増幅され、反応の終了時にはこの領域の 10^6 倍以上のコピーが発生した。

a. 増幅反応

出発核酸材料は、Maniatis et al., 前記文献、により記載されているグアニジウム イソチオシアネート塩化セシウム勾配法によりHIV-1-感染CEM細胞(ヒトリンパ芽球細胞株: Folks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4531 (1985)) から抽出されたセシウムペレット化RNAであった(HIV-1 特異的配列は存在する全核酸の1-10%と推定された)。

十分の一 アトモルの標的核酸を、最終濃度で

40mM Tris:HCl, pH 8.1

12mM MgCl₂

25mM NaCl

2mM スペルミジン (HCl) ,

5mM ジチオスレイトール

80 μg/ml BSA

各々1mMの dATP, dCTP, dGTP, dTTP

各々1mMの ATP, CTP, GTP, UTP

各々0.25 μg 開始オリゴヌクレオチド (88-211 および88-347、以下参照)

を含む反応混合物(全量100 μl)に置いた。

反応成分は1.5mlのエッペンドルフ チューブ中で混合し、続いてボルテックスで簡単に軽くかきまぜた。標的核酸は水浴中65℃にて1分間チューブを加熱することにより変性させた。37℃に1分間冷却した後以下の酵素が添加された:

25単位 AMV逆転写酵素 (15-25単位/μl)

100単位 T7 RNAポリメラーゼ (100単位/μl)

4単位 大腸菌RNaseH (2単位/μl)

反応は37℃で3時間、さらに何の操作をすることなく進行させた。

b. 増幅生成物の検出

約1時間後、生成物は増幅断片内の30塩基対領域に相補的な³²P-標識オリゴヌクレオチドを用いて検出された(88-298)。

全容量の1/40の反応液の1部を取り、95.0 μgの7.4%ホルムアルデヒドおよび10×SSC (Maniatis et al., 前記文献) 中、水浴に入れ55℃で20分間変性させる。すぐ、氷冷し、スロット-プロット装置を通してニトロセルロース膜上へ詰める。核酸はUV照射により(254nm)ニトロセルロースへ固定化された。

固定化後、フィルターを0.5%BSA、0.5%ポリビニルピロリドン、5×SSPE (20×=3.6M NaCl, 200mM NaH₂PO₄, 20mM EDTA, pH7-8) および1%SDSを含むフィルター平方センチ当たり50-100 μlの緩衝液中55℃にて15分間プレハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは2-5×10⁶cpm/mlのリン酸化オリゴヌクレオチドプローブを含む同じ緩衝液中55℃で2時間行った。プローブをプリハイブリダイゼーション緩衝液に添加された。フィルターは1ml緩衝液/cm²フィルター、1×SSPE、1%SDSを用いて各々3分間室温で3回洗浄し、次に同じ緩衝液中55℃にて1分間洗浄した。

フィルターは-70℃にて1つの補力スクリーンによりオートラジオグラフィーを行った。

増幅のレベルは増幅された生成物により引き起こされる信号の強度を既知の量のHIV-1 RNAまたはpARV7A/2 (Luciw et al., Nature 312, 760 (1984))、pUC19のEcoRI部位内へ挿入されたHIV-1 ゲノムのcDNAコピーを含むプラスミド、により引き起こされる信号の強度と比較することにより算出した。

上に記載した実施例において、増幅のレベルは1×10⁶であった。検出プローブ88-297および88-298を用いる生成物のノーサンブロットおよびサザン ブロットは生成物がRNAが優性な種であるDNAおよびRNAの混合物であったことを示している。生成物は狭い範囲(20-40bp)内の不連続の大きさであった(〜210bp)。

2. 第2のHIV-1 env 領域の増幅

第2のHIV-1 env 領域の増幅は実施例1に記載した方法に従って達成された、ただし、開始オリゴヌクレオチド87-284および88-347(下記参照)が増幅のために使用され、検出には検出オリゴヌクレオチド86-272および86-273(下記参照)が使用された。10³倍の増幅が達成された。

3. HIV-1 sor 領域の増幅

HIV-1 sor 領域の増幅は実施例1に記載されている方法に従って達成された。ただし、増幅のためには開始オリゴヌクレオチド88-77および87-292(下記参照)が使用され、検出には検出オリゴヌクレオチド86-31および86-32(下記参照)が使用された。10³倍の増幅が達成された。

4. AIDS患者からの血液の臨床試料からの第1のHIV-1 env 領域の増幅

3つのHIV-1 感染臨床試料からのRNAが増幅された。RNAは有機抽出プロトコール(下記参照)により抽出された。

開始オリゴヌクレオチド88-211および88-347（下記参照）および検出オリゴヌクレオチド88-297および88-298（下記参照）を用いて実施例1のごとく増幅が実施された。

試料の2つの陽性の結果を示した。これらの実験の反応において全体の増幅は 10^5 倍であった。増幅後に検出される信号は反応の初期に存在する出発物質の濃度に直接比例するので（実施例5参照）、第3の臨床試料はHIV-1に感染されていないと同定することが可能であり、なぜなら出発標的HIV-1配列をほとんど含んでいないからである。

5. 種々の量のHIV-1感染CEM細胞と混合された非感染CEM細胞中の第1のHIV-1 envの増幅

開始オリゴヌクレオチド88-211および88-347（下記参照）および検出オリゴヌクレオチド88-297および88-298（下記参照）を用いて実施例4のごとく、増幅が実施された。

10^6 の非感染CEM細胞の集団中の 10^3 から1のHIV-1感*

88-211 : (開始オリゴヌクレオチド ; nt 6450-6479 ;

env)

5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGATCTATTGTGCCCCGGCT

GTTTTGCGATTCTA-3'

88-297 : (検出オリゴヌクレオチド ; nt 6560-6531 ;

env)

5'-TGGCCTAATTCCATGTGTACATTGTACTGT-3'

88-298 : (検出オリゴヌクレオチド ; nt 6531-6560 ;

env)

5'-ACAGTACAATGTACACATGGAATTAGGCCA-3'

88-347 : (開始オリゴヌクレオチド ; nt 6661-6632 ;

env)

5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGATGTACTATTATGGTTTT

AGCATTGTCTGTGA-3'

88-77 : (nt 5018-4988 ; sor) 開始

5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGACACCTAGGGCTAACTAT

GTGTCCTAATAAGG-3'

* 染CEM細胞からの全核酸抽出物を用いる標的増幅（実施例7参照）は信号が試料中に存在する感染細胞の数に比例することを示した。陰性対照物（ 10^6 非感染CEM細胞）はわずかなバックグラウンド信号を示した。このバックグラウンド信号は10の感染CEM細胞試料から得られた信号よりも有為に小さかった。

6. 試薬およびオリゴヌクレオチド

a. 試薬 : ヌクレオチド三リン酸はシグマから、AMV逆転写酵素はライフサイエンスから、T7 RNAポリメラーゼはストラタジーンから大腸菌リボヌクレアーゼHおよびBSAはベセスダリサーチラボから入手された。

b. オリゴ類 : オリゴヌクレオチドはアプライド バイオシステムズ380Aを用いてホスホルミルアミダイト化学により合成され、HPLCにより精製された。

プライマーおよびプローブとして使用されたオリゴヌクレオチドはHIV-1およびenvおよびsor領域に対しRatner et al., Nature 313, 277 (1995) により報告されている対応する配列に特異的であった。

87-292 : (nt 4766-4796; sor)²¹開始²²

5'-TAATACGACTCACTATAGGGAAAGAATAAGTTC
AGAAGTACACATCCCACT-3'

86-31 : (nt 4901-4932; sor) 検出

5'-GCACACAAGTAGACCCTGAAGTAGCAGACCA-3'

86-32 : (nt 4932-4901; sor) 検出

5'-TGGTCTGCTAGTTCAGGGTCTACTTGTGTGC-3'

87-284 : (nt 6551-6579; env) 開始

5'-TAATACGACTCACTATAGGGAAATTAGGCCAGT
AGTATCAACTCAACT-3'

86-272 : (nt 6591-6620; env) 検出

5'-TCTAATTACTACCTCTTCTTCTGCTAGACT-3'

86-273 : (nt 6620-6591; env) 検出

5'-AGTCTAGCACAAGAAGAGGTAGTAATTAGA-3'

各々の開始オリゴヌクレオチドは5'末端にT7 RNAポリメラーゼ結合配列(下線)および好適な転写開始部位(ボールド)である配列を含んでいる。配列の残りは標的配列に対し相補的である。

HIV-1 標的配列に関し、オリゴヌクレオチド88-211、88-298、87-292、86-31、87-284および86-273 30は負の鎖に対して相補的であり、オリゴヌクレオチド88-347、88-297、88-77、86-32および86-272は正の鎖に対し相補的である。

7. RNAの有機抽出

感染細胞試料の核酸調製のためのプロトコール:

ペレット細胞: 1ml トリス緩衝化塩溶液から5Krpm 10分。

上清を取り捨てる(50μℓをペレットと共に残す)。

600μℓの溶菌緩衝液にペレットを再懸濁する。

激しく渦を巻かせ、50℃で45分インキュベートする、 4010分毎に10-15秒渦を巻かせてかき混ぜる。

600μℓのフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(50:48:2)を加える。振とうおよび渦を巻かせて混合物を乳化させる。相分離のための2分間14krpmで遠心分離する。

水層(上層)から575μℓを抜く。600μℓのフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(50:48:2)を添加する。振とうし、渦を巻かせて混合物を乳化する。相分離のため2分間14Krpmで遠心分離する。

水層から525μℓを抜く。600μℓのクロロホルム:イ 50

ソアミルアルコール(24:1)を加える。振とうし、渦を巻かせて混合物を乳化させる。分離のため2分間14Krpmで遠心分離する。

水層から400μℓを抜く(界面に存在するであろう細胞破片を移さないようにする)。

1/10容量(40μℓ)の8M LiClを加える。この工程で試料は処理のため分離される。

分離されている試料に3容量の100%冷エタノールを加える。分離されていない試料には2.5容量の氷冷100%エタノールを加える。よく混合する。-20℃で一晩またはドライアイス/エタノール浴で15分間沈殿させる。

試薬

溶菌緩衝液

20mM トリス pH7.5

150mM NaCl

10mM EDTA

0.2% SDS

200μg/ml 蛋白質リン酸化酵素K

トリス緩衝化塩溶液

137mM NaCl

5.1mM KCl

24.8mM トリス塩基

1NHClでpHを7.4に調製する。

オートクレーブ滅菌する。

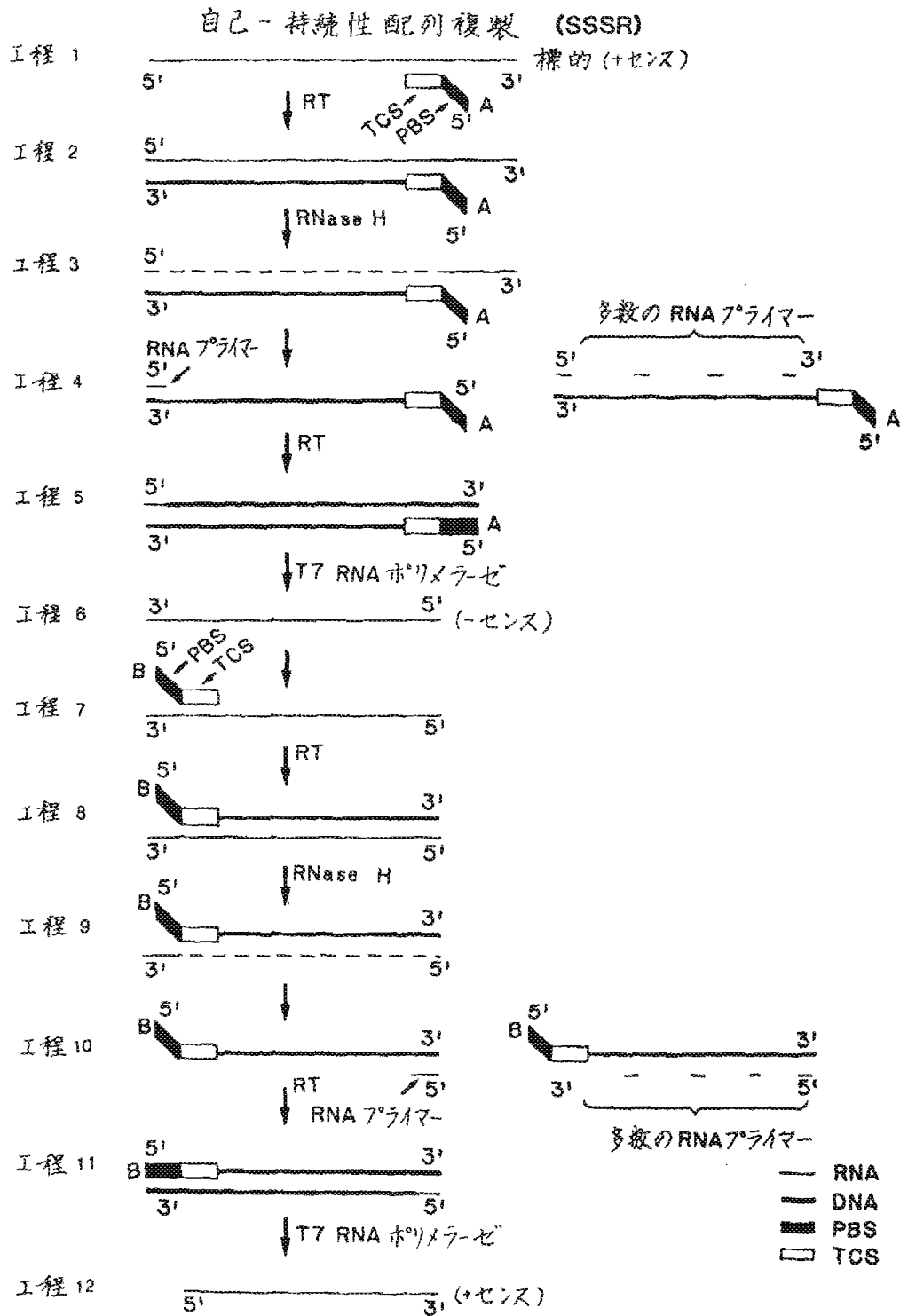
前述の記載は本発明の実施に用いることができるであろう特定の方法を詳述したものである。この文書の等温

23

増幅系の説明に最初に使用された詳細な特定の方法を知ると、当業者は等温単一容器道具立てにおけるものと類似の増幅を生じ、およびこの情報を特定の記載されている以外の標的核酸に拡大する別の等価な方法をどのように工夫すればよいかを十分に知るであろう。それ故、

24

本文には前述のものが詳述されて現れているであろうが、全体の範囲を制限するものと解釈してはならない；むしろ、本発明の範囲は付随する請求の範囲の法律上有効な解釈のみに支配されるべきである。



フロントページの続き

(72)発明者 ホイットフィールド, クリスティナ・マ
 リー
 アメリカ合衆国カリフォルニア州92009,
 カールスバッド, ガリオン・ウェイ
 7678

(56)参考文献 特開 平2-5864 (J P, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/10 - 15/11

BIOSIS (DIALOG)

MEDLINE (STN)

WPI (DIALOG)